

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年6月10日 (10.06.2004)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2004/047851 A1

(51)国際特許分類: A61K 38/00, A61P 9/00, 9/10, 43/00

(21)国際出願番号: PCT/JP2003/015201

(22)国際出願日: 2003年11月27日 (27.11.2003)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:

特願 2002-346325

2002年11月28日 (28.11.2002) JP

特願 2003-391243

2003年11月20日 (20.11.2003) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 岡田 泰伸 (OKADA,Yasunobu) [JP/JP]; 〒444-0877 愛知県岡崎市竜美旭町12-13 Aichi (JP). 森島 繁 (MORISHIMA,Shigeru) [JP/JP]; 〒910-0337 福井県坂井郡丸岡町新鳴鹿2-100-C-3-101 Fukui (JP). 鍋倉 隆 (NABEKURA,Takashi) [JP/JP]; 〒880-0929 宮崎県宮崎市まなび野1-14-2 Miyazaki (JP). 眞鍋健一 (MANABE,Ken-ichi) [JP/JP]; 〒444-0878 愛知県岡崎市竜美東2-8-36-1-A Aichi (JP). 森 信一郎 (MORI,Shin-ichiro) [JP/JP]; 〒444-0851 愛知県岡崎市久後崎町字三島下6-403 Aichi (JP).

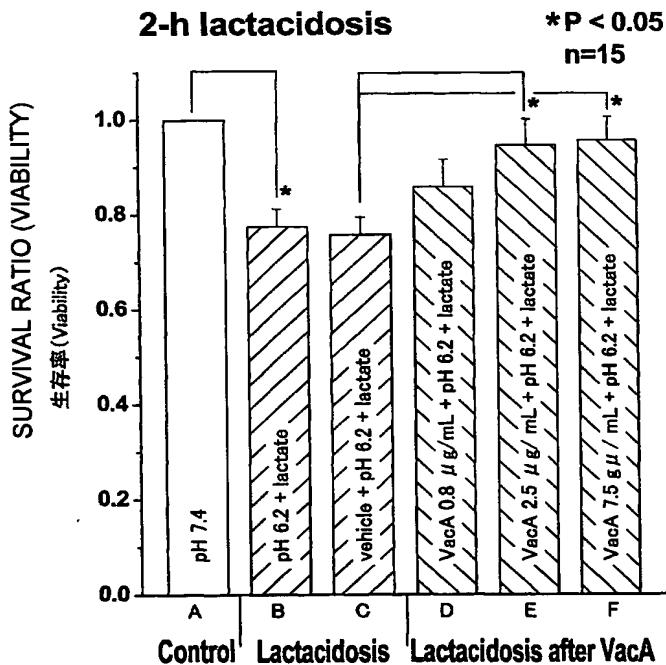
(74)代理人: 原謙三 (HARA,Kenzo); 〒530-0041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル 原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81)指定国(国内): CN, KR, SG, US.

(続葉有)

(54)Title: METHOD OF INHIBITING CELL DEATH, CELL DEATH INHIBITOR AND REMEDY FOR DISEASE CAUSED BY CELL DEATH CONTAINING THE CELL DEATH INHIBITOR

(54)発明の名称: 細胞死の抑制方法、細胞死抑制剤、及びその細胞死抑制剤を含む細胞死に起因する疾患の治療薬剤



(57)Abstract: A method of inhibiting cell death characterized by administering an anion channel-forming peptide, which artificially forms an anion channel on cell membrane, to cells under lactacidosis; and a cell death inhibitor characterized by containing this anion channel-forming peptide. As an example of the anion channel-forming peptide, *Helicobacter pylori*-origin VacA protein or a glycine receptor channel mutant peptide may be cited. The above-described method of inhibiting cell death and the cell death inhibitor are particularly efficacious against necrotic cell death associated with cell swelling.

(57)要約: 本発明の細胞死の抑制方法は、細胞膜上にアニオニチャネルを人工的に形成するアニオニチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与することを特徴とするものであり、本発明の細胞死抑制剤は、このアニオニチャネル形成ペプチドを含むことを特徴とするものである。このアニオニチャネル形成ペプチドの一例として、ヘリコバクターピロリ菌由来のVacAタンパク質、あるいは、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを挙げることができる。本発明の細胞死抑制方法及び細胞死抑制剤は、細胞膨張を伴うネクローシス性細胞死に特に有効に作用するものである。



(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

明細書

細胞死の抑制方法、細胞死抑制剤、及びその細胞死抑制剤を含む細胞死に起因する疾患の治療薬剤

技術分野

5 本発明は、血液供給の障害によって起こる虚血などの病的現象によつて発生する細胞死、特に、乳酸アシドーシス下における細胞膨張を伴うネクローシス性の細胞死を抑制する方法、このような細胞死を抑制する細胞死抑制剤、及びこのような細胞死に起因する疾患の治療薬剤に関するものである。

10

背景技術

脳血管障害などの病態において、脳内が虚血に陥ると、しばしば乳酸の蓄積を伴ったアシドーシスに陥ることが知られている。この状態を乳酸アシドーシスと呼ぶ。乳酸アシドーシスに陥ったグリア細胞や神経細胞は、虚血環境の改善がない限り、やがては虚血性細胞死に陥ることが知られている。これまでに、このような細胞死を抑制するために多くの薬剤が開発・研究されてきた。

20 乳酸アシドーシス下では、これらの細胞の容積は持続的に膨張することが知られている。このような細胞の膨張を伴って細胞死に至るものは、ネクローシス性細胞死と呼ばれている。本願発明者等は、乳酸アシドーシス下において細胞容積の持続的な膨張は、（少なくとも神経細胞やグリア細胞においては）容積調節性アニオンチャネルが抑制されているた

めであることを明らかにしている。これまでに、上記容積調節性アニオニンチャネルは、特に低浸透圧（低張）刺激時などにおける細胞膨張後に見られる調節性容積減少（RVD）において、必要不可欠なチャネルであることが知られている。このため、乳酸アシドーシス下において、その機能が抑制されている容積調節性アニオニンチャネルの機能に代替し得る物質を投与することにより、この持続的な細胞膨張を抑制できる可能性があると考えられている。
5

ところで、細胞死には、上述の細胞の膨張を伴うネクローシス性細胞死以外に、細胞の収縮を伴うアポトーシス性細胞死がある。このアポトーシス性細胞死を抑制するには、アニオニンチャネルブロッカーを使用してアニオニンチャネルの働きを抑制するという方法が有効であるということが、本願発明者等の研究グループをはじめとしていくつかのグループによって報告されている。特許文献1（特開2002-3402公報（公開日：平成14年1月9日））は、その一例であり、細胞死に起因する疾患の治療にも有用な手段となる可能性があることが報告されている。
10
15

上述のように、これまでにアポトーシス性細胞死の抑制方法・抑制剤の研究・開発は盛んに行われてきた一方で、ネクローシス性細胞死の抑制方法・抑制剤についての報告例は確認されていない。即ち、乳酸アシドーシス下において、容積調節性アニオニンチャネルの機能に代替し得る物質を投与し、アニオニンのみを透過させる人工的アニオニンチャネルを形成することをメカニズムとするネクローシス性細胞死の抑制剤が実用化されている例はない。
20

その原因の一つとして、カチオン選択性、または、カチオン・アニオ

ン双方を透過させるイオノフォア（人工的にイオンチャネルやイオントランスポータを形成させる物質）は、グラミシジンやナイスタチンなど、従来からよく知られていたにもかかわらず、アニオン選択性のイオノフォア（アニオンイオノフォア）は、ごくわずかしか知られていないことが挙げられる。しかし近年、ヘリコバクターピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) 由来のV a c Aタンパク質（非特許文献1：Cover TL, Blaser MJ, 「Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*」, *J. Biol. Chem.*, 267, 10570-10575, 1992年：参照）、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドなどが（非特許文献2：Wallace DP, Tomich JM, Iwamoto T, Henderson K, Grantham JJ, Sullivan LP, 「A synthetic peptide derived from glycine-gated Cl⁻ channel induces transepithelial Cl⁻ and fluid secretion」, *Am. J. Physiol.*, 272, C1672-C1679, 1997年：及び非特許文献3：Mitchell KE, Iwamoto T, Tomich J, Freeman LC, 「A synthetic peptide based on a glycine-gated chloride channel induces a novel chloride conductance in isolated epithelial cells」, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1466, 47-60, 2000年：参照）上記アニオンイオノフォアとしての機能を有するということが明らかにされている。

そこで、本発明は、上記アニオンイオノフォアを用いて人工的アニオンチャネルを形成することをメカニズムとする細胞死の抑制方法、細胞死抑制剤、及びその細胞死抑制剤を含む細胞死に起因する疾患の治療薬剤を提供することを目的とする。

発明の開示

本願発明者等は、虚血中の乳酸アシドーシスにおいてしばしば見られるグリア細胞膨張とそれに続くネクローシス性細胞死とが、容積調節性アニオンチャネルの機能不全によるものであること、及び、ヘリコバクターピロリ菌由来のV a c Aタンパク質が人工的にアニオンチャネルを形成するという性質に着目し、上記V a c Aタンパク質を乳酸アシドーシス下の細胞に投与することによって、その細胞死が抑制されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明に係る細胞死の抑制方法は、アニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与することを特徴とするものである。また、本発明に係る細胞死抑制剤は、アニオンチャネル形成ペプチドを含むことを特徴とするものである。

細胞膜上に存在するイオンチャネルは、細胞膜を貫通するタンパク質で、細胞膜を越えて特定のイオンを通す重要な経路であり、細胞内外の物質のやり取りや情報の受け渡しに重要な役割を果たしている。アニオンチャネルは、このイオンチャネルの一種であり、アニオンのみを選択的に透過させるイオンチャネルである。したがって、上記「アニオンチャネル形成ペプチド」とは、上述のようなアニオンチャネルを人工的に形成する外来性のペプチドを意味する。また、上記ペプチドには、オリゴペプチドからポリペプチドに至るまで、種々のアミノ酸残基数からなるものが含まれる。それゆえ、上記ペプチドにはタンパク質も含まれるものとする。

一般に細胞は、低張刺激負荷などによってその容積を強制的に膨張させられた場合、その後しばらくすると、元の容積に回復する現象を示す。

この現象は、調節性容積減少（RVD）と呼ばれている。しかし、脳梗塞を発症した場合に起こる脳虚血時にしばしば見られる乳酸アシドーシス条件下では、脳神経細胞及びグリア細胞（神経膠細胞）の容積が膨張したまま元の容積に回復せず、やがて細胞死に陥ることが知られている。

5 即ち、乳酸アシドーシス時には容積感受性アニオンチャネルが阻害されていることによって、RVDが起きないために細胞死が起こる。

本発明の細胞死の抑制法及び細胞死抑制剤では、上記アニオンチャネル形成ペプチドの作用によって、細胞膜上に人工的にアニオンチャネルを形成させて、RVDを引き起こし、持続的な細胞膨張を抑制させることができる。そして、後述の実施例にも示すように、細胞死を抑制し、細胞の生存率を改善させることができる。このように、上記細胞死の抑制方法及び細胞死抑制剤は、細胞死の中でも特に、乳酸アシドーシス下における細胞膨張を伴うネクローシス性の細胞死を抑制する効果を奏するものである。

15 なお、上記Vacaを投与することによって、乳酸アシドーシスによって膨張したグリア細胞にアニオンチャネルを形成すること、及び、上記アニオンチャネルの形成によって、膨張したグリア細胞にRVDが生じることについては、本願発明者等によって非特許文献4（第78回日本生理学会大会予稿集、254頁、1PA76、（発行日：2001年
20 3月1日））において既に公表されている。

しかしながら、上記非特許文献4にはアニオンチャネルの形成およびそれに伴うRVDによって、ネクローシス性の細胞死が有意に減少し、細胞死の抑制という疾患の予防及び治療的意義については記載されていない。即ち、後述の実施例に記載されている、アニオンチャネル形成ペ

プチド (V a c A タンパク質、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチド) の投与によって、細胞死が有意に減少し、細胞の生存率が改善するという事実は、本出願によって初めて明らかにされるものである。

上記アニオンチャネル形成ペプチドとして具体的には、ヘリコバクターピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) 由来の V a c A タンパク質、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを挙げることができる。これらは、実施例にも示すように、乳酸アシドーシス条件下において、実際に細胞の持続的膨張を抑制させることができることが確認されている。

本発明の細胞死の抑制方法において、上記細胞死は、細胞膜不透過性蛍光色素ヨウ化プロピジウム (P I) による核染色性を指標として判断されるものであってもよい。また、本発明の細胞死抑制剤において、上記ネクローシス性の細胞死の抑制は、細胞膜不透過性蛍光色素ヨウ化プロピジウムによる核染色性の喪失により評価されるものであってもよい。これはつまり、本発明においては、細胞死の判断を、細胞膜不透過性蛍光色素ヨウ化プロピジウム (P I) による核染色性を指標として行うこともできるということを意味する。上記の細胞死の判断方法については、後述の実施例において説明する。

またさらに、本発明の細胞死の抑制方法において、上記細胞死は、ミトコンドリア脱水素酵素の活性の顕著な低下を伴うものであってもよい。また、本発明の細胞死抑制剤において、上記ネクローシス性の細胞死の抑制は、ミトコンドリア脱水素酵素活性の低下を防御することにより評価されてもよい。これはつまり、本発明においては、細胞死の判断を、ミトコンドリア脱水素酵素活性を指標として行うこともできるということを意味する。この細胞死の判断方法についても、後述の実施例において

て説明する。

上記の各細胞死の判断方法を用いることによって、本発明の細胞死の抑制方法および細胞死抑制剤を利用した場合の細胞死抑制効果を、容易に判定することができる。

5 本発明に係る細胞死の抑制方法及び細胞死抑制剤は、虚血中の乳酸アシドーシス下において見られる細胞膨張およびそれに続く細胞死（特に、ネクローシス性細胞死）を抑制することができる。虚血性細胞死は、種々の虚血性疾患に伴って発生するものであり、これを阻止することによって、脳機能不全や心機能不全さらには死亡を防止することができる
10 と考えられる。即ち、上記細胞死の抑制方法及び細胞死抑制剤は、細胞死に起因する種々の疾患の予防及び治療に有効に利用することができる。従って、本発明には、上記細胞死抑制剤を含み、細胞死に起因する疾患の治療に使用される治療薬剤も含まれる。

さらに、上記細胞抑制剤は、種々の細胞の中でも特にグリア細胞の細胞死を効果的に抑制することができるため、上記細胞死抑制剤を含む本発明の治療薬剤は、グリア細胞死に起因する疾患の治療に使用されることが好ましい。

本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分分かるであろう。また、本発明の利点は、次の説明によって明白になるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、C6グリア細胞に対して、乳酸アシドーシス、アシドーシス、及び、乳酸を投与した場合に細胞容積に与える影響を調べた結果

を示すグラフである。

図2は、C6グリア細胞において、乳酸アシドーシス、アシドーシスを生じさせた場合、及び、乳酸を投与した場合の、RVDに対する影響を調べた結果を示すグラフである。

図3(a)～(d)は、VacaAを投与してブレインキュベートされたC6グリア細胞において、全細胞電流記録法によって記録された電流を示すものである。図3(a)から図3(c)は、-80～+80mVのステップパルスを加えた場合の、電流の反応を記録した結果を示すグラフである。なお、図3(a)は、pH7.4(コントロール条件)で、VacaAを投与した場合、図3(b)は、乳酸アシドーシス下でVacaAを投与した場合、図3(c)は、pH7.4でVacaA及びNPPBを投与した場合である。図3(d)は、コントロール(○)、乳酸アシドーシス(●)、NPPBを含む場合(□)、それぞれにおける瞬間電流の電流-電圧相関を示すグラフである。

図4(a)～(d)は、C6グリア細胞において、全細胞電流記録法によって観察されたVacaA誘導電流のアニオン選択性を示すものである。図4(a)は、ランプ波を加えることによって測定された電流-電圧相関を示すグラフであり、細胞外Cl⁻濃度が異なる場合のそれぞれの結果を示す。図4(b)は、逆転電位と、細胞外Cl⁻濃度の対数との相関を示すグラフである。図4(c)は、アニオンを置換した場合に、電流-電圧曲線に与える影響を示すグラフである。図4(d)は、カチオン及びアニオンを置換した場合に、電流-電圧曲線に与える影響を示すグラフである。

図5は、C6グリア細胞における乳酸アシドーシスによる細胞膨張

に対して、V a c Aあるいはグラミシジンを投与した場合の細胞容積変化を調べた結果を示すグラフである。

図6は、C 6 グリア細胞における乳酸アシドーシスによる細胞膨張に対して、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを投与した場合の細胞容積変化を調べた結果を示すグラフである。なお、このグラフにおいては、相対細胞容積を%で示す。

図7は、C 6 グリア細胞における乳酸アシドーシス条件下で、V a c Aの投与の有無による細胞の生存率を調べた結果を示すグラフである。

図8は、ミトコンドリア脱水素酵素の活性を指標として、乳酸アシドーシス条件（1時間処理）下のC 6 グリア細胞の生存率を調べた結果を示すグラフである。

図9は、ミトコンドリア脱水素酵素の活性を指標として、乳酸アシドーシス条件（2時間処理）下のC 6 グリア細胞の生存率を調べた結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明についてより詳細に説明する。

本発明に係る細胞死の抑制方法は、アニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下のグリア細胞に投与することを特徴とするものであり、また、本発明に係る細胞死抑制剤は、アニオンチャネル形成ペプチドを含んでなるものである。

ここで、上記アニオンチャネル形成ペプチドとしては、例えば、ヘリコバクターピロリ菌由来のV a c Aタンパク質、グリシンレセプタチャ

ネルの変異体ペプチド、コレラ菌溶血性毒素などを挙げることができる。

上記V a c Aタンパク質は、動物の胃内に生息するヘリコバクターピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) 毒素から単離されたものであり、人工脂質二重層膜上など、異所的にアニオンチャネルを形成することが知られている（非特許文献1参照）。このV a c Aタンパク質は、上記非特許文献1に記載の方法に基づいて単離することができる。なお、このV a c Aタンパク質には、非特許文献1に記載された一次構造のもののみでなく、アニオンチャネルを形成するという機能が損なわれない程度に、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたタンパク質も含まれる。即ち、上記V a c Aタンパク質の変異タンパク質も上記アニオンチャネル形成ペプチドに含まれるものとする。

また、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドは、上記非特許文献2及び上記非特許文献3に記載されているように、グリシンレセプター α サブユニットのポア形成部位に相当する第2膜貫通領域（M2）の23個のアミノ酸からなるポリペプチドにおいて、そのカルボキシ末端に4個のリジンを加えて水溶性を高めたポリペプチドである。このグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドは、上皮細胞モノレイヤーのC1-分泌を高めることや、上皮細胞のC1-コンダクタンスを高めることができると報告されている。上記グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドの作製および取得は、非特許文献2及び非特許文献3に記載の方法に基づいて実施することができる。

上記コレラ菌溶血性毒素の性質及び取得方法については、以下の参考文献1、2に記載されている。

参考文献1：Zitzer A, Palmer M, Weller U, Wassenaar T, Biermann

C, Tranum-Jensen J, Bhakdi S, 「Mode of primary binding to target membranes and pore formation induced by *Vibrio cholerae* cytolysin (hemolysin)」, Eur. J. Biochem., 247, 209-216, 1997 年

参考文献 2 : Moschioni M, Tombola F, de Bernard M, Coelho A,

5 Zitzer A, Zoratti M, Montecucco C, 「The *Vibrio cholerae* hemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death」, Cell. Microbiol., 4 (7), 397-409, 2002 年

本発明の細胞死抑制剤は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サルなど）に対し、細胞死に起因する疾患（特に、ネクローシスの促進が関わる疾患であることが好ましい）の予防または治療薬剤として用いることができる。上記疾患としては、例えば、心筋梗塞、脳虚血などの虚血性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患、うつ血性心不全などが挙げられる。後述の実施例に示されるように、V a c Aタンパク質などのアニオンチャネル形成ペプチドを含む上記細胞死抑制剤は、虚血後の乳酸アシドーシス下のグリア細胞膨張を抑制することから、上記疾患の中でも特に、虚血性疾患の予防および治療に使用されることが好ましい。また、本発明の細胞死抑制剤は、上記疾患が 1 種の場合にも、複数の疾患が併発した場合にも適用することができる。

20 本発明の細胞死抑制剤は、上記「アニオンチャネル形成ペプチド」のみを含み、それを直接投与して使用することもできるが、通常、上記アニオンチャネル形成ペプチドに加えて、薬理学的に許容される担体がさらに含まれていてもよい。このような細胞死抑制剤の製造は、従来公知の製造方法によって行うことができる。

上記薬理学的に許容される担体としては、製剤素材として一般に使用可能な各種有機または無機担体物質を用いることができる。これらは、
5 固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤として、あるいは、
液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁剤、等張化剤、緩衝剤、無痛
化剤などとして配合される。また、上記細胞死抑制剤における「アニオ
ンチャネル形成ペプチド」としてのV a c Aタンパク質の含量は0. 2
～7. 5 μ g / m l であることが好ましく、2. 5～7. 5 μ g / m l
であることがより好ましい。なお、上記V a c Aタンパク質は、使用直
前に酸性溶液 (p H 2) によって活性化させておくことが必須である。

10 本発明の細胞死抑制剤の剤形としては、例えば、錠剤、カプセル剤
(ソフトカプセル、マイクロカプセルを含む)、散剤、顆粒剤、シロップ
剤などの経口剤のほか、注射剤、坐剤、ペレット、点滴剤などの非経
口剤が挙げられる。これらは毒性も低く、それぞれ経口的あるいは非経
口的に投与できる。

15 [実施例]

以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。但し、本発明は
この実施例の記載に限定されるものではない。本実施例では、本発明に
係る細胞抑制剤に含まれるアニオンチャネル形成ペプチドの一例である、
V a c Aタンパク質及びグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドが、
20 乳酸アシドーシス下での細胞膨張を抑制できることを確認した。以下に
は、その確認実験の方法、結果などを示す。

(1) 実験方法

[細胞培養法]

ラットのアストログリア細胞系統のC 6グリオーマ細胞系列（参考文

文献 : Benda et al.、「Differentiated rat glial strain in tissue culture」、Science 161、370-371、1968) は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) から取得され、ダルベッコの最小必須培地 (D M E M) を用いて、37°C、5 % の C O₂ を含む加温エア内でペトリ皿あるいは培養用フラスコ中で单層培養された。上記培地には、25 mM の炭酸水素イオン、10 % のウシ胎児血清、100 I U / m l のペニシリン G、及び、50 m g / m l のストレプトマイシンが添加された。0.05 % トリプシンと 0.02 % E D T A を含むリン酸緩衝溶液 (P B S) を用いたトリプシン処理によって、单層培養細胞がはがし取られた。細胞は、800 r p m で1 分間遠心分離され。上清は除去された。トリプシン活性を抑制するために、細胞はウシ胎児血清を含む D M E M 内に懸濁され、2 回目の遠心分離が行われた後、上清が除去された。続いて、上記の細胞は、以下の電解質を含み、血清を含まない溶液に懸濁された。

電解質 : 125 mM N a C l 、2.5 mM K C l 、2.0 mM C a C l₂ 、1.0 mM M g C l₂ 、1.25 mM N a H₂ P O₄ 、25 mM N a H C O₃

この細胞懸濁液は、実験に使用されるまで、95 % 空気と 5 % の C O₂ の気泡によって飽和されることによって、37°C、p H 7.4 で保存された。

[細胞容積測定法]

細胞容積は、流動細胞数測定器 (フローサイトメータ : EPICS Elite ESP、Coulter Co.、Miami、FL) を使用するコールターの原理に基づいて評価された。細胞の生存率についても、ヨウ化プロピジウム遮断テス

トによって細胞数測定に基づいて評価された。10m1の細胞懸濁液は、10mg/m1のヨウ化プロピジウムを含む2μlのPBSを添加した後、37℃で1分間インキュベートされた。細胞の平均容積は、2×10⁴個の細胞を含む350μlの細胞懸濁液を、上記流動細胞測定器に所定の時間内に注入することによって測定された。基準の細胞容積は、5
コントロール溶液(pH7.4)で20分間インキュベートされる前と後との測定値の平均として得られた。pH6.2のアシドーシスの効果、及び、pH6.2の乳酸アシドーシスあるいはpH7.4の乳酸の効果は、その後、以下に示すように、塩酸、乳酸、あるいは、乳酸とトリスとをそれぞれ添加することによって観察された。細胞は、コントロール
10(pH7.4)、酸性(pH6.2)溶液、あるいは、乳酸を含むpH6.2の乳酸アシドーシス溶液(これらは全て等張性である)でプレインキュベートされた後、30%の体積の脱イオン蒸留水で上記等張性の溶液を希釈することによって、低張刺激負荷の効果についても観察され
15た。

細胞容積測定のために用いられたコントロール溶液の組成は、125
mM NaCl、2.5mM KCl、2mM CaCl₂、1.0m
MgCl₂、10mM glucose、1.25mM NaH₂PO₄、
25mM NaHCO₃(pH7.4、in 95%空気/5%CO₂)
20
であった。乳酸アシドーシスの効果を調べるために、培地のpHが、等
張性の乳酸溶液を滴下することによって6.2に滴定され、乳酸の最終
濃度が25mMに調製された。アシドーシスの効果を調べるために、培
地のpHが、塩酸を用いてpH6.2に滴定された。乳酸単独の効果を
調べるために、25mM乳酸を含む培地のpHが、7.5mMの適量

のトリスを加えることによって pH 7.4 に調整された。凝固点降下浸透圧計 (Vogel GmbH, Giessen, Germany) によって測定された重量モル浸透圧濃度は、コントロール溶液、乳酸含有酸溶液、乳酸含有トリス緩衝溶液、それぞれに対して 300、306、312 m osmol/kg-H₂O であった。

[電気生理学法]

全細胞電流記録法 (パッチクランプ法) による観察は、室温 (23~25 °C) で実施され、参考文献 (Kubo M., Okada Y., 「Volume-regulatory Cl⁻ channel currents in cultured human epithelial cells」、J. Physiol. 456, 351-371, 1992) に記載の方法に基づいて、ワイドチップ電極 (~2 MΩ) を使用して記録された。直列抵抗 (< 5 MΩ) は、電圧誤差を最小化するために、60~70% に補正された。電流変化の時間経過が、0 mV から ±40 mV の保持電位から交流のステップパルス (持続時間 1 s) を 1.5 秒ごとに加えることによってモニタリングされた。全細胞の容積感受性電流の電圧依存性をモニターするために、ステップパルス (持続時間 2 s) が -60 mV (持続時間 2 s) の前電位から加えられ、膨張誘導電流が定常状態活性化に達した後に、-60 mV から +100 mV の電位が 20 mV 毎に試験された。V_{acA} 誘導電流をモニターするために、ステップパルス (持続時間 300 ms) が -80 mV (持続時間 300 ms) の前電位から加えられ、-80 から +80 mV の電位が 20 mV 毎に試験された。ステップパルス印加後 2.5 ms の瞬間電流が記録された。容積感受性電流あるいは V_{acA} 誘導電流の電流-電圧曲線 (I-V 曲線) をモニターするため、ランプパルスが -40 mV から +60 mV の範囲内で 0.5 s 間加

えられた。電流は、EPC-9増幅器（HEKA、Lambrecht、Germany）を用いて記録された。電流信号は、1 kHzで濾波され、4 kHzでデジタル化された。パルス+パルスフィットソフトウェア（version8.11；HEKA）が指令パルス制御、データ収集、及び解析に使用された。

ほぼすべての細胞のパッチクランプ実験のために、次の溶液（電解槽）およびピペット溶液が使用された。

等張性（320 m osmol/kg-H₂O）電解槽溶液：110 mM CsCl、5 mM MgSO₄、90 mM マンニトール、10 mM HEPES（CsOHでpH 7.4に滴定されたもの）を含む。

細胞膨張は、マンニトールが40 mMに減らされた低張性（270 m osmol/kg-H₂O）の溶液で誘導された。ピペット（細胞間）溶液（290 m osmol/kg-H₂O）は、110 mM CsCl、2 mM MgSO₄、2 mM Na₂ATP、1 mM EGTA、60 mM マンニトール、及び1 mM HEPES（CsOHでpH 7.2に滴定されたもの）を含む。実験に応じて、10 mM 1,2-ビス（2-アミノフェノキシ）エタン-N, N, N', N' -テトラ酢酸（BAPTA）が、1 mM EGTAの代わりにピペット溶液に加えられた。容積感受性Cl⁻チャネルあるいはV_{acA}誘導チャネルのアニオン透過性を調べるために、等張性電解槽溶液中で、塩素が等モル濃度のヨウ素、臭素、アスパラギン酸、あるいは、メタンスルホン酸と置き換えられた。V_{acA}チャネルの透過性についても、次の溶液を使用して調べられた。

等張性（315 m osmol/kg-H₂O）電解槽溶液：145 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM MgCl₂、10 mM マンニトール、2

5 mM CaCl_2 、10 mM HEPES（トリスでpH 7.4に滴定されたもの）を含む。

5 ピペット（細胞間）溶液（300 m osmol/kg- H_2O ）：30 mM NaCl、80 mM KCl、2 mM MgCl₂、70 mM マンニトル、1 mM EGTA、2 mM Na_2ATP 、10 mM HEPES（pH 7.2）を含む。

0 アスパラギン酸で115 mMの細胞外Cl⁻を置換することによって、相対アニオン透過性が調べられた。相対カチオン透過性は、75 mM Na⁺及び70 mM N-メチル-D-グルカミン（NMDG）で145 mMの細胞外Na⁺を置換することによって調べられた。

（2）結果及び考察

[乳酸アシドーシス下におけるグリア細胞の容積変化]

15 図1には、pH 7.4のコントロール条件下（○）、乳酸アシドーシス下（■）、アシドーシス下（▲）、乳酸投与下（◆）、それぞれの場合のグリア細胞の細胞容積変化を、相対細胞容積で経時的（単位：分）に記録したグラフを示す。

コントロール条件下では、C6グリア細胞の平均細胞容積は、 $802.4 \pm 39.4 \mu\text{m}^3$ であり、図1の○で示すように、1時間変化することはなかった。乳酸を添加せずに培地のpHを6.2に下げたもの（即ち、アシドーシス下）は、細胞容積にわずかな変化が認められた（図中、▲で示す）。対照的に、25 mMの乳酸の投与によって培地のpHが6.2に下げられた場合（即ち、乳酸アシドーシス下）には、細胞容積に顕著な増加が認められた（図中、■で示す）。その平均細胞容積は、投与後2分で基準となる細胞容積のレベルの 1.06 ± 0.02 倍に増加し

た。そして、緩やかに膨張し続けた後、45分から60分以内に頭打ちの状態に達した（60分後には1:11±0.02倍になった）。しかしながら、培地のpHが7.4に維持された場合（図中、◆で示す）には、乳酸単独では顕著な膨張は誘導されなかった。これらの結果から、
5 グリア細胞膨張は、酸性化のみ、あるいは、乳酸のみでは何れも誘導されず、乳酸アシドーシスによって誘導されることがわかった。

[乳酸アシドーシス下におけるRVDの阻害]

図2には、pH 7.4のコントロール条件の状態（○）、乳酸のみを投与した場合（◆）、アシドーシス下の場合（△）、乳酸アシドーシス下の場合（■）、それぞれのC6グリア細胞の細胞容積の変化を記録した
10 グラフを示す。

低張刺激負荷（70%オスモル濃度）が行われると、グリア細胞は一時的に膨張し、引き続いてコントロール状態下に回復することが確認された（図2の○で示す）。RVDが乳酸アシドーシスによって影響されるか否かを調べるために、細胞は乳酸を含む酸性（pH 6.2）等張性溶液でプレインキュベートされ、その後、乳酸アシドーシスを維持しながら低張性溶液に浸された。この場合は、図2に■で示すように、乳酸アシドーシス条件下であり、RVDは起こらなかった。しかしながら、
15 pH 7.4で乳酸をえた場合には、RVDはほぼ通常どおり引き起こされた（図2中、◆で示す）。乳酸が欠如した場合には、酸性条件（pH 6.2、図中△で示す）下でRVDは一部のみ阻害された。

このように、通常の細胞においては、一時的な細胞膨張の後に発生するRVDが、乳酸アシドーシス下では起こらず、細胞が持続的に膨張し続けることが示された。この結果から、乳酸アシドーシス下では、最終

的にネクローシス性細胞死に至ることが示唆される。

また、データは示さないが、この細胞容積の持続的な膨張は、容積調節性の C 1 - チャネルの機能が抑制されていることに起因することが本実験において確認された。

5 [V a c A の投与によるグリア細胞膜上でのアニオンチャネルの形成]

続いて、V a c A タンパク質を投与した場合に、グリア細胞膜上にアニオンチャネルが人工的に形成されることを確認した結果を示す。なお、V a c A は、上記非特許文献 1 に記載の方法によって、ヘリコバクターピロリ菌 60190 から精製され、酸性 (p H 2) のリン酸緩衝液によって、0 37 °C で 10 分間、活性化前処理が施されたものが使用された。

上記 V a c A を 2. 5 μ g / ml となるように加え、37 °C で 50 分間 C 6 グリア細胞をインキュベートした場合、光学顕微鏡で観察すると、細胞の形態変化は誘導されなかった。これは、細胞からのヨウ化プロピジウムの排除 (即ち、非染色性) によって判断されるように、培地にはアンモニウムのような補足的な弱い塩基が添加されていないので、細胞の生存率に影響を与えないことが原因であると推定できる。しかし、結果として電流は大きく活性化される。上記電流は、時間依存性の活性化や不活性化のキネティクスを発揮することなく (図 3 (a) 参照)、わずかな外向き整流性のみを示す (図 3 (d) 中、○で示す)。乳酸アシドーシス (p H 6. 2) 条件下で記録される V a c A 誘導電流に対する電流 (図 3 (b) 参照) と I - V 相関 (図 3 (d) 中、●で示す) とは、コントロール条件下で記録された電流に対するそれ (図 3 (d) 中、○で示す) と見分けることができない。V a c A 誘導電流は、ピペット溶

液中の 10 mM の BAPTA の含有物によって影響を受けない (データ示さず)。NPPB (100 μ M) の細胞外添加は、Vacaによって仲介される電流を強く阻害する (図 3 (c) 参照、図 3 (d) 中口で示す)。

5 このように、Vacaをグリア細胞に投与すると、乳酸アシドーシス下においてもチャネルを形成し、そのチャネルを流れる電流がパッチクランプ法 (全細胞法) によって確認された。また、図 3 (c)、(d) に示されるように、この電流は、Cl⁻チャネルプロッカとして知られるNPPBによって抑制されることからも、アニオンチャネルによるものであることがわかる。

10 続いて、C6グリア細胞において、全細胞法によって観察されたVacaによる誘導電流がアニオン選択性を示す (即ち、アニオン透過性チャネルであることを示す) ことを確認した実験の結果を以下に示す。図 4 (a) は、ランプ波を加えることによって測定された電流-電圧関係を示すグラフであり、細胞外Cl⁻濃度が異なる場合 (5 mM、30 mM、110 mM の各場合) のそれぞれの結果を示す。図 4 (b) は、逆転電位と、細胞外Cl⁻濃度の対数との相関を示すグラフである。図 4
15 (c) は、Cl⁻をI⁻、Br⁻、methansulfonate⁻にそれぞれ置換した場合に、電流-電圧曲線に与える影響を示すグラフである。図 4 (d) は、カチオン及びアニオンを置換した場合に、電流-電圧曲線に与える影響を示すグラフである。

20 アスパラギン酸との置換による [Cl⁻]oの減少は、Vacaによって仲介される電流の逆転電位の右側へのシフトを誘導する (図 4 (a)、(b) 参照)。このことは、Vacaによって仲介される電流

がアニオン電流であることを示している。細胞外 $C1^-$ の他のアニオン種 (I^- 、 Br^- 、 $methansulfonate^-$) との置換における逆転電位のシフトも観察される (図 4 (c) 参照)。これらの結果は、以下の表 1 にまとめられるように、 $P_I > P_{Br} > P_{C1} > P_{methansulfonate} > P_{aspartate}$ というアニオン透過性の順番を示す。

【表 1】

$VacA$ によって誘導されるアニオンチャネルの各アニオン透過性 (P_x/P_{Cl^-})

アニオン (X^-)	$VacA$
I^-	1.64 ± 0.16
Br^-	1.13 ± 0.14
$C1^-$	1
$Methansulfonate^-$	0.45 ± 0.14
$Aspartate^-$	0.27 ± 0.08

また、 70mM 細胞外 Na^+ の等モル濃度の NMDG との置換において、逆転電位におけるわずかなシフトのみが観察されるように、 $VacA$ によって仲介されるチャネルは、ごくわずかなカチオン透過性 ($P_Na^+ / P_{Cl^-} = 0.18 \pm 0.06$) を有することが分かった (図 4 (d) 参照)。

以上のように、本実験では、図 3 及び図 4 に示すように、ヘリコバクターピロリ菌の $VacA$ タンパク質の投与によって、C6グリア細胞の細胞膜のアニオンコンダクタンスが増加されることが見出された。また、この $VacA$ による表 1 に示すようなチャネル透過性は、平面的な脂質二重層膜において $VacA$ によって誘導されるチャネルにおけるチャネル透過性と類似している。さらに、本実験では、 $VacA$ によるアニオン電流は、乳酸アシドーシスに関係なく誘導され (図 3 参照)、細胞内 Ca^{2+} には依存しないことが確認された。この結果から、 $VacA$

c Aによって誘導されるチャネルは、細胞質Ca²⁺の依存性の欠如に関して、多くの細胞種において見られるCa²⁺活性化Cl⁻チャネルとも別のものであることが示唆される。

これらの事実をまとめると、V a c AはC 6 グリア細胞の形質膜における外向き整流性・容積感受性アニオンチャネルとは異なり、乳酸アシドーシス下でも機能的に活性を持つアニオンチャネルを形成することができるということが言える。

〔乳酸アシドーシスによる細胞膨張のV a c A事前投与による回復〕
次に、C 6 グリア細胞における乳酸アシドーシスによる細胞膨張に対して、V a c Aあるいはグラミシジン（カチオンイオノフォアを示す）を投与した場合の細胞容積変化を調べた実験結果について、図5のグラフを用いて以下に説明する。図5には、V a c Aあるいはグラミシジンを投与した場合の、時間（分）の経過における相対細胞容積の変化を示す。なお、細胞容積の基本レベルは、正常状態（乳酸アシドーシスが起きていない状態）においてV a c Aを投与した場合のものとし、図5中では10
15 ◇で示す

乳酸アシドーシスによる細胞膨張は、乳酸アシドーシス下でV a c Aなどの投与なしのもの（図5中■で示す）と比較して、V a c Aが投与されたC 6 グリア細胞（図5中▼で示す）において顕著に減少する。V
20 a c Aが投与された細胞は、乳酸アシドーシスに反応して一時的にのみ膨張し、約15分後に基本レベルの約1. 05±0. 02倍のピークに達した。しがしながら、その後、乳酸アシドーシスが維持されたにもかかわらず、細胞容積は徐々に減少し、45から60分以内で基本レベルにほぼ近いレベル（60分後には約0. 99±0. 02倍）にまで達し

5

た。V a c Aを投与した細胞では、乳酸アシドーシスに誘導される一時的な細胞膨張の後の容積調節が、100 μMのN P P Bによって阻害される（図5中、▲参照）。対照的に、C 6グリア細胞が0.5 μMのグラミシジンで前処理された場合、乳酸アシドーシスによる持続的な細胞膨張が抑制されなかった（図5中、●参照）。

10

これらの結果から、乳酸アシドーシスによる持続的な細胞膨張は、アニオンチャネルを形成するV a c Aの事前投与によって抑制され、細胞は元の容積に回復するが、カチオンチャネルを形成するグラミシジンの投与によっては抑制されず、細胞は膨張し続けることが確認された。また、容積感受性C 1-チャネルの機能を抑制するチャネルブロッカであるN P P Bを投与した場合には、V a c Aの投与によって形成されたアニオンチャネルの働きが抑制され、細胞容積の減少は起こらないことも確認された。

15

以上のように、本実験では、V a c Aによって誘導されるアニオン透過性の発現が、持続的な乳酸アシドーシス下でC 6グリア細胞に容積調節の能力を与えるということを実証した（図5参照）。この結果は、乳酸アシドーシスによって誘導される外向き整流性・容積感受性アニオンチャネルの損傷は、乳酸アシドーシス下でのR V Dの機能障害の原因となるということを示すものである。

20

[グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドの投与によるR V Dの誘導]

次に、もう一つのアニオンチャネル形成ペプチドであるグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを、乳酸アシドーシス下のC 6グリア細胞に投与した場合の細胞容積変化を調べた結果について、図6を用いて説明

する。

図 6 のグラフでは、コントロール状態 (pH 7. 4 の正常状態) の細胞容積変化を○で示し、pH 7. 4 (正常状態) においてグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを投与した場合の細胞容積変化を●で示し、5 乳酸アシドーシス下においてグリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを投与した場合の細胞容積変化を▲で示している。図 6 に示すように、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドを C 6 グリア細胞に投与することによって、乳酸アシドーシス下において、細胞の持続的な膨張は抑制され、むしろ細胞容積が減少することが明らかとなった。

0 [細胞膨張下での RVD の誘導による細胞死の減少]

続いて、乳酸アシドーシス下にある細胞に、アニオンチャネル形成ペプチドの一つである V a c A を投与することによって、実際に細胞死が抑制されるか否かについて確認を行った。本実施例では、以下の 2 つの方5 法によって細胞死の測定を行った。

5 (a) 細胞膜不透過性蛍光色素ヨウ化プロピジウム (P I) による核染色性を指標とした細胞死の測定

まず、乳酸アシドーシス 1 時間後までの C 6 グリア細胞ネクローシス性細胞死への V a c A 投与効果を、細胞膜不透過性蛍光色素ヨウ化プロピジウム (P I) による核染色性を指標に調べた。その結果を、図 7 を用10 いて説明する。

図 7 は、C 6 グリア細胞における乳酸アシドーシス下で、V a c A の投与の有無による細胞のコントロール細胞 (pH 7. 4 の正常状態に置かれたもの) に対する生存率 (%) (P I 核染色性を示すネクローシス性死細胞の割合) をフローサイトメトリにより検討した結果を示すグラ

フである。図7においては、乳酸アシドーシス下の細胞（VacA投与なし）の生存率を▲で示し、アシドーシス下の細胞の生存率を▼で示し、正常状態の細胞にVacAを投与した場合の細胞の生存率（コントロール）を◇で示し、乳酸アシドーシス下の細胞にVacAを投与した場合の細胞の生存率を△で示している。図7に示すように、乳酸アシドーシス下においては、VacAを投与しない場合（▲）に比べて、VacAを投与した場合（△）に、細胞の生存率が改善することが示された。つまり、乳酸アシドーシス下でも、VacAを事前投与（50分）しておくと（△の場合）、生存率が改善される傾向が見られることが確認された。

また、例数を増やして同様の実験を行った結果を表2に示す。

【表2】

条件	VacA 事前処理	乳酸アシドーシス 1時間後の生存率	有意差
アシドーシス (pH6.2 塩酸)	なし	95±0.8% (n=8)	—
乳酸アシドーシス (pH6.2 乳酸)	なし	93±0.5% (n=8)	P<0.001
乳酸アシドーシス (pH6.2 乳酸)	あり	96±0.3% (n=8)	P>0.1

5

20

表2に示すように、VacAを投与しない場合、乳酸アシドーシス1時間後の生存率は93%であるのに対し、VacA投与下では96%と

有意に改善した。そして、この96%という生存率は、乳酸添加なしのアシドーシス条件での生存率95%と有意差を示さなくなった。

以上の結果から、乳酸アシドーシス下にある細胞は、VacAなどのアニオングルーパス形成ペプチドの投与によってRVDが誘導され、持続的な細胞膨張を抑制することができる事が確認された。さらにその結

果、細胞死を抑制し、細胞の生存率を向上させることができるということが確認された。この結果は、上記アニオンチャネル形成ペプチドを用いた本発明の胞死の抑制方法、及び、上記アニオンチャネル形成ペプチドが含まれる本発明の細胞死抑制剤の有効性を実証するものであると言える。
5

(b) ミトコンドリア脱水素酵素活性を指標にした細胞死の測定

次に、外来性アニオンチャネルV a c Aの事前導入による乳酸アシドーシス（1時間処理）による細胞死に対する抑制効果が、ミトコンドリア脱水素酵素活性を指標にして細胞死を測定しても再現されるかどうかを
10 調べた。その結果を図8に示す。

図8は、C6グリア細胞を乳酸アシドーシス条件で1時間処理した後の細胞の生存率を示すグラフである。このグラフにおいて、A：コントロール（pH 7.4）、B：乳酸アシドーシス条件下（pH 6.2）、C：乳酸アシドーシス条件下（溶剤添加、pH 6.2）、D：V a c A
15 (0.8 μg/m1) を投与した場合の乳酸アシドーシス条件下（pH 6.2）、E：V a c A (2.5 μg/m1) を投与した場合の乳酸アシドーシス条件下（pH 6.2）、F：V a c A (7.5 μg/m1) を投与した場合の乳酸アシドーシス条件下（pH 6.2）、である。

図8に示すように、MTTアッセイ法によって測定したC6細胞の脱水素酵素活性（すなわち、細胞の生存率）は、乳酸アシドーシス1時間処理後には約70%まで低下したが（図8B、C参照）、V a c Aの事前投与により酵素活性（生存率）の低下は、約80%にとどまり（図8E、F参照）、有意に細胞死の抑制効果を示すことが示された。
20

また、乳酸アシドーシス条件下でさらに時間を置いたときのグリア細

胞死に対しても V a c A が抑制効果を示すかどうかを調べた。その結果を図 9 に示す。

図 9 は、 C 6 グリア細胞を乳酸アシドーシス条件で 2 時間処理した後の細胞の生存率を示すグラフである。このグラフにおいて、 A : コントロール (pH 7. 4) 、 B : 乳酸アシドーシス条件下 (pH 6. 2) 、 C : 乳酸アシドーシス条件下 (溶剤添加、 pH 6. 2) 、 D : V a c A (0. 8 μ g / m l) を投与した場合の乳酸アシドーシス条件下 (pH 6. 2) 、 E : V a c A (2. 5 μ g / m l) を投与した場合の乳酸アシドーシス条件下 (pH 6. 2) 、 F : V a c A (7. 5 μ g / m l) を投与した場合の乳酸アシドーシス条件下 (pH 6. 2) 、である。

図 9 に示すように乳酸アシドーシス 2 時間処理でも同様に、 C 6 細胞の脱水素酵素活性は約 75 % まで低下したが (図 9 B、 C 参照) 、 V a c A を事前投与することにより酵素活性の低下は約 95 % にとどまり (図 9 E、 F 参照) 、有意にグリア細胞死の抑制効果を示すことが示された。

なお、 V a c A 効果に濃度依存性が認められるかどうかを検討するために、異なる 3 種の濃度の V a c A で事前処理を行い、その効果を調べた。その結果、図 8 の D ~ F 、および、図 9 の D ~ F に示すように、乳酸アシドーシス 1 時間処理、 2 時間処理いずれにおいても V a c A は濃度依存的にその抑制効果を示した。つまり、 V a c A の濃度が高い方が細胞死抑制効果が高いことが示された。具体的には、 V a c A の濃度は、 2. 5 μ g / m l 以上が好ましい。

これらの結果は、 V a c A によるアニオンチャネルの導入によって、乳酸アシドーシス下での細胞膨張からの R V D 達成が可能となり、これ

によってグリア細胞の乳酸アシドーシス下でのネクローシス死も救済されることを示している。

(3) 結論

5 乳酸アシドーシス下では、グリア細胞の膨張は、MCT（モノカルボン酸輸送体）を介してプロトン及び乳酸が取り込まれることによって誘発され、容積調節を行うことなく膨張し続けると考えられる。この容積調節の欠損は、容積感受性C1-チャネル活性の損傷が原因となって起こる。乳酸アシドーシスによって誘導される膨張の後に起こる容積調節は、カチオン透過体であるグラミシジンによって形成されるカチオンチャネルではなく、アニオン透過体であるV_acAによって形成される外因性アニオンチャネルの誘導によって可能となる。

10 脳虚血によって起こる乳酸アシドーシスは、細胞障害性の脳浮腫の主要な要因である。グリア細胞は、細胞障害性の脳浮腫に最も関連の深い細胞である。それゆえ、乳酸アシドーシスによって誘導されるグリア細胞膨張を抑制し、細胞容積を減少させること（即ち、RVDを発生させること）は、脳虚血による脳浮腫の予防法および治療法の開発のために非常に有効であると言える。

15 本実験では、容積感受性アニオンチャネル阻害が、グリア細胞における乳酸アシドーシスに誘導される持続的な容積膨張に寄与すること、及び、グリア細胞へのV_acA投与によるアニオンコンダクタンスの誘導が、乳酸アシドーシスによって誘導される一時的な細胞膨張の後に容積調節の能力を回復させることを実証した。

20 以上のように、乳酸アシドーシス下に置かれたグリア細胞にアニオンイオノフォアであるV_acAタンパク質あるいはグリシンレセプタチャ

5 ネル変異体ペプチドを投与することによって、その細胞死を抑制できることが明らかになった。この細胞死抑制メカニズムは、持続的細胞膨張から細胞容積を回復することによって達成されたものと考えられる。このメカニズムは、全く新しい発見であり、これまでに開発してきたあらゆる虚血性疾患の治療薬及び治療方法とも異なるものである。また、
乳酸アシドーシス下には、グリア細胞のみならず、神経細胞も同様のメカニズムで持続的細胞膨張が起こっていることが明らかになっており、
神経変性疾患の原因となる神経細胞死の抑制にも、本発明の細胞死の抑制方法を適用できる可能性が高いと考えられる。

10 尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

15

産業上の利用の可能性

20 以上のように、本発明の細胞死の抑制方法は、アニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与することを特徴とするものである。また、本発明の細胞死抑制剤は、アニオンチャネル形成ペプチドを含むことを特徴とするものである。

これらは、虚血中の乳酸アシドーシス下において見られる細胞膨張およびそれに続く細胞死（特に、ネクローシス性細胞死）を抑制することができる。そのため、細胞死に起因する種々の疾患の予防及び治療に有效地に利用することができる。また、本発明の細胞死の抑制方法及び細胞

死抑制剤は、従来の虚血性障害を抑制させる薬剤とは全く異なる新しいメカニズムによって細胞死を抑制するものであるため、利用価値が高いと言える。

本発明の治療薬剤は、上記の細胞死抑制剤を含み、細胞死に起因する種々の疾患の治療に使用されるものである。この治療薬剤は、脳のみならず心臓などにおいても、種々の疾患に伴う虚血性細胞死及び臓器障害を抑制する薬剤として用いられ、生命の予後の改善や虚血性諸疾患の改善に大きく寄与するものと考えられ、有用性が高いと考えられる。

請求の範囲

1. アニオンチャネル形成ペプチドを乳酸アシドーシス下の細胞に投与する細胞死の抑制方法。
- 5 2. 上記細胞死は、ネクローシス性の細胞死である請求の範囲 1 に記載の細胞死の抑制方法。
3. 上記細胞死は、細胞膜不透過性蛍光色素ヨウ化プロピジウムによる核染色性を指標として判断されるものである請求の範囲 1 または 2 に記載の細胞死の抑制方法。
- 10 4. 上記細胞死は、ミトコンドリア脱水素酵素の活性の顕著な低下を伴うものである請求の範囲 1 または 2 に記載の細胞死の抑制方法。
5. 上記アニオニンチャネル形成ペプチドは、ヘリコバクターピロリ菌由来のV_ac_Aタンパク質である請求の範囲 1 から 4 の何れか 1 項に記載の細胞死の抑制方法。
- 15 6. 上記アニオニンチャネル形成ペプチドは、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドである請求の範囲 1 から 4 の何れか 1 項に記載の細胞死の抑制方法。
7. アニオニンチャネル形成ペプチドを含むことを特徴とする細胞死抑制剤。
- 20 8. ネクローシス性の細胞死を抑制する請求の範囲 7 に記載の細胞死抑制剤。
9. 上記ネクローシス性の細胞死の抑制は、細胞膜不透過性蛍光色素ヨウ化プロピジウムによる核染色性の喪失により評価されるものである請求の範囲 7 または 8 に記載の細胞死抑制剤。

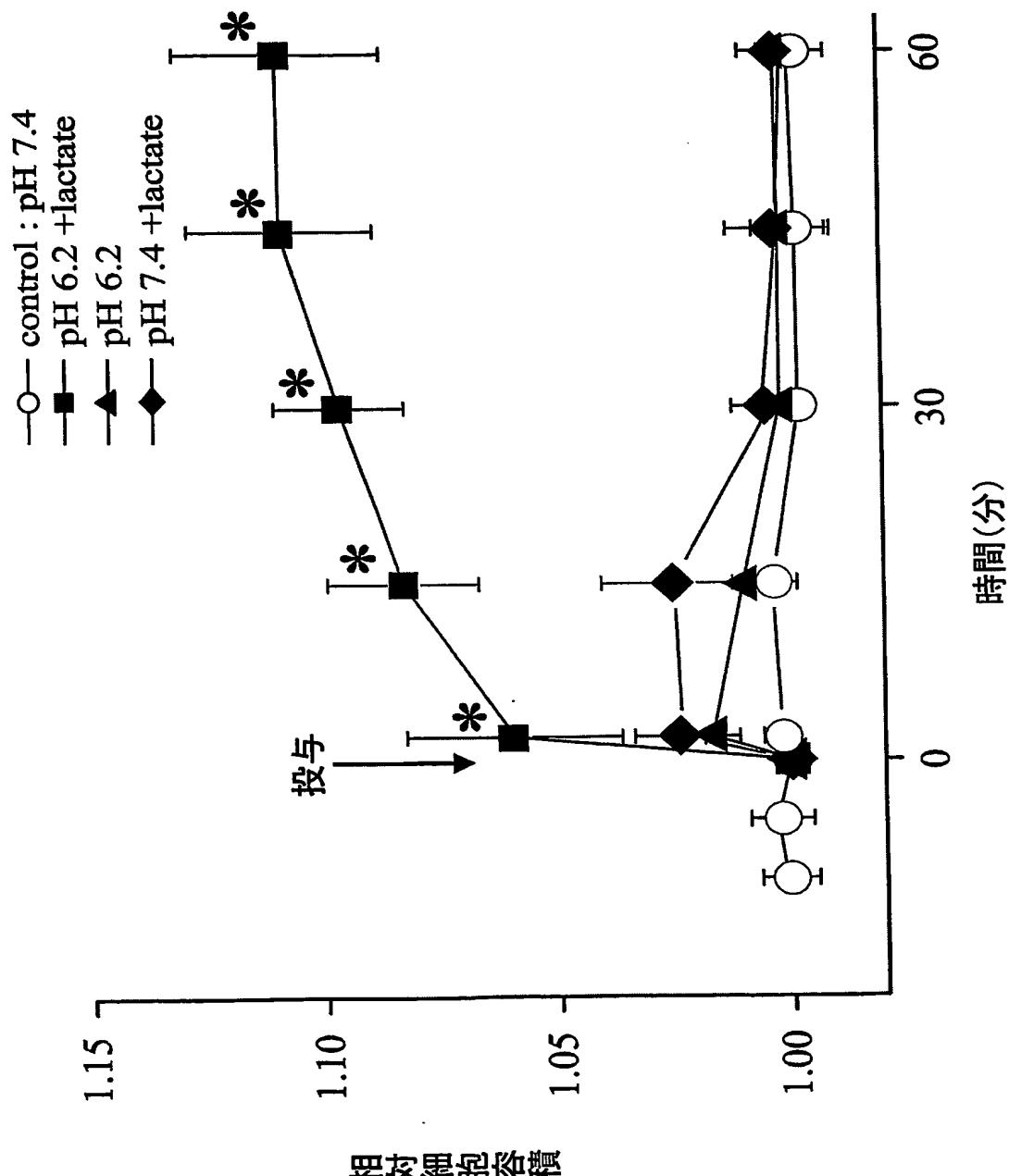
10. 上記ネクローシス性の細胞死の抑制は、ミトコンドリア脱水素酵素活性の低下を防御することにより評価されるものである請求の範囲7または8に記載の細胞死抑制剤。

11. 上記アニオンチャネル形成ペプチドは、ヘリコバクターアイロリ菌由来のV_ac_Aタンパク質である請求の範囲7から10の何れか1項に記載の細胞死抑制剤。

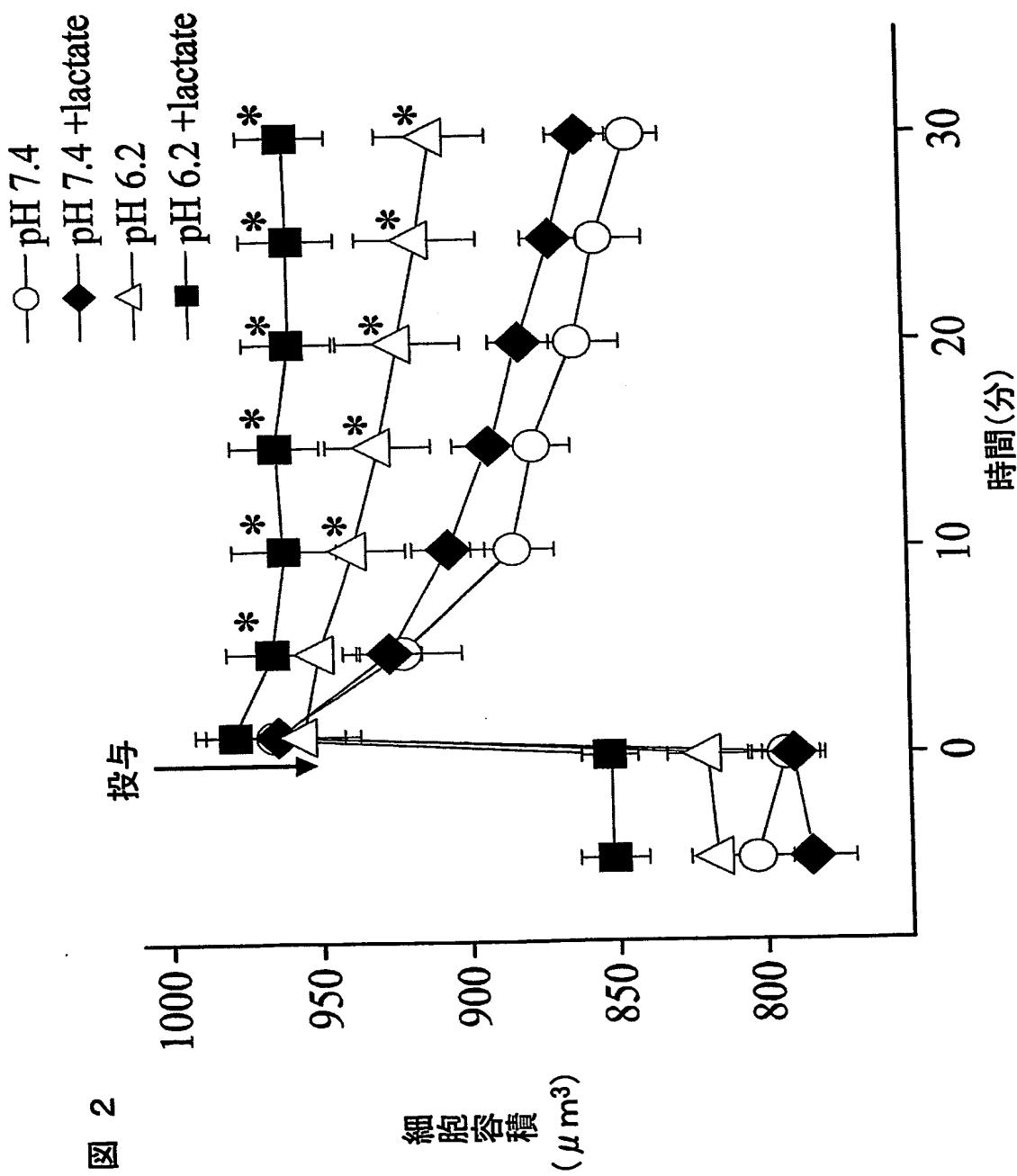
12. 上記アニオンチャネル形成ペプチドは、グリシンレセプタチャネル変異体ペプチドである請求の範囲7から10の何れか1項に記載の細胞死抑制剤。

13. 請求の範囲7から12の何れか1項に記載の細胞死抑制剤を含み、細胞死に起因する疾患の治療に使用される治療薬剤。

14. グリア細胞死に起因する疾患の治療に使用される請求の範囲13に記載の治療薬剤。



一

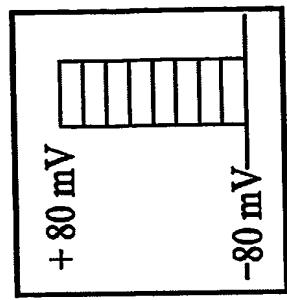


3 / 9

図 3 (a)
pH 7.4+VacA
図 3 (b)
pH 6.2+lactate+VacA



図 3 (c)



pH 7.4+VacA+NPPB

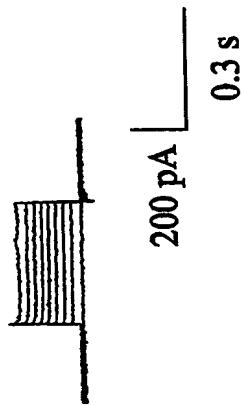
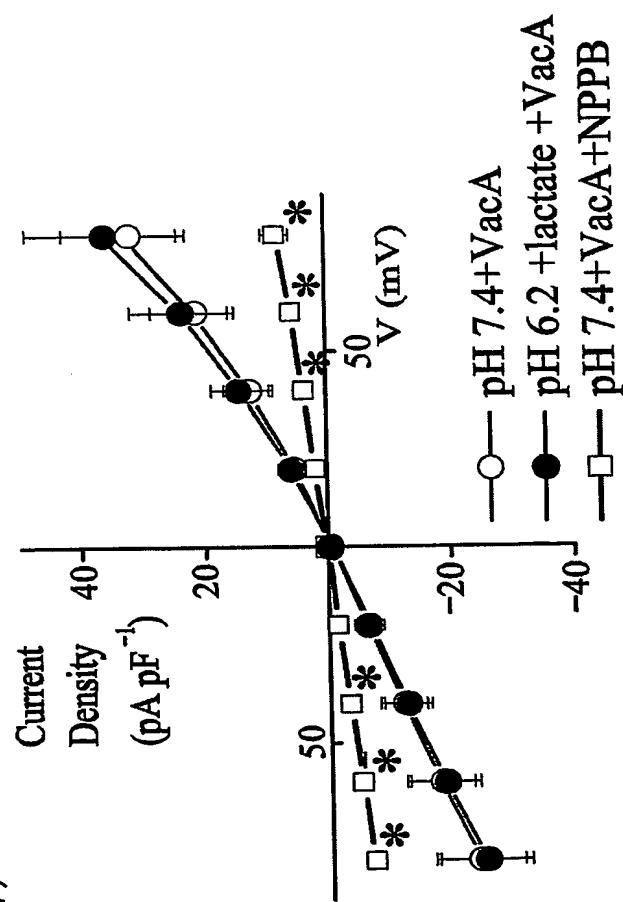


図 3 (d)



4/9

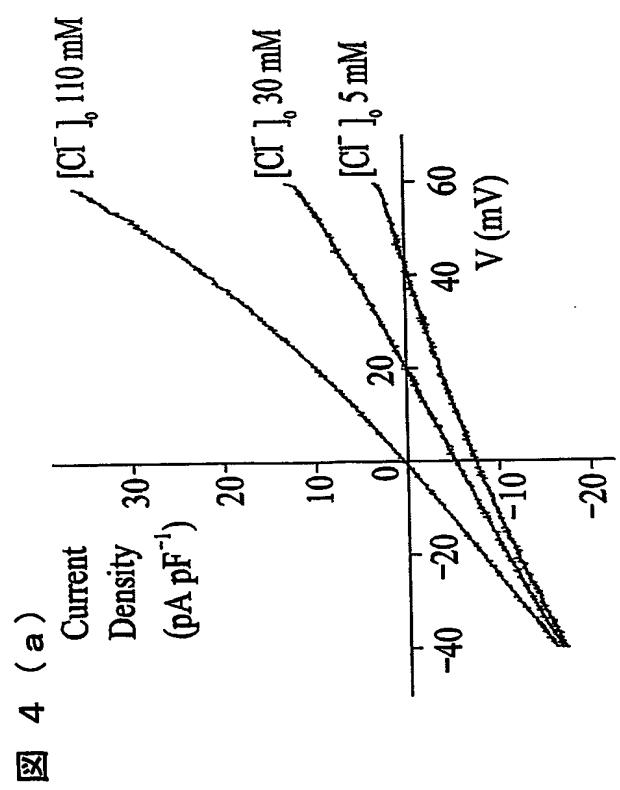


図 4 (b)

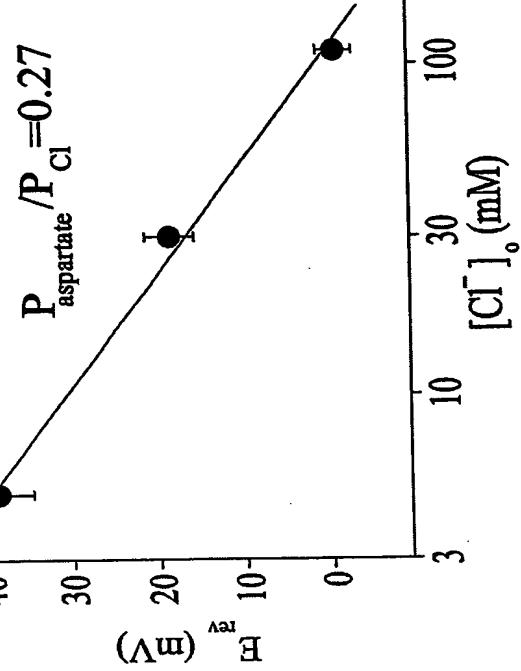


図 4 (c)

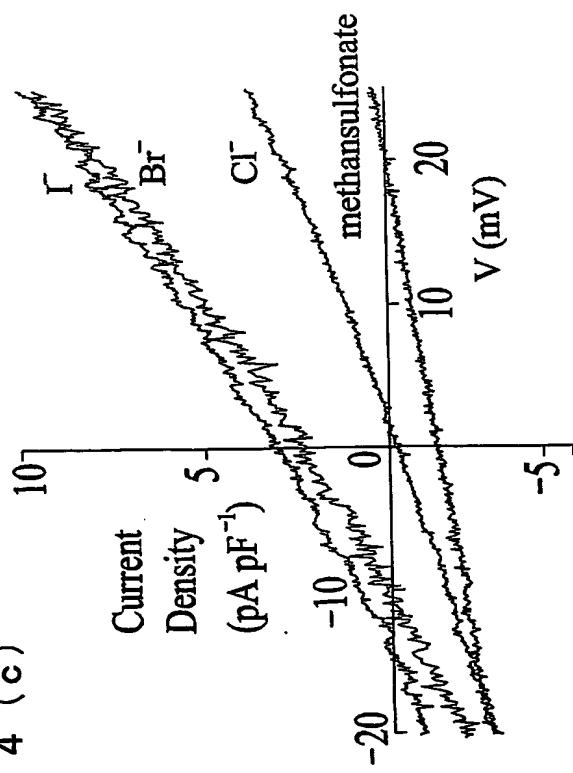
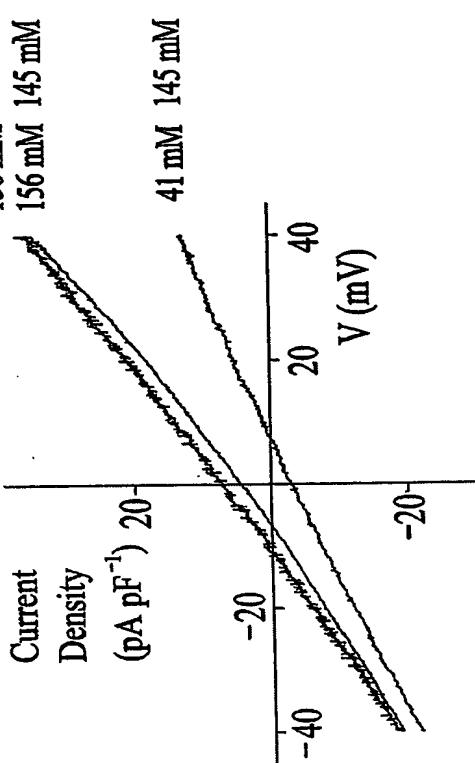


図 4 (d)



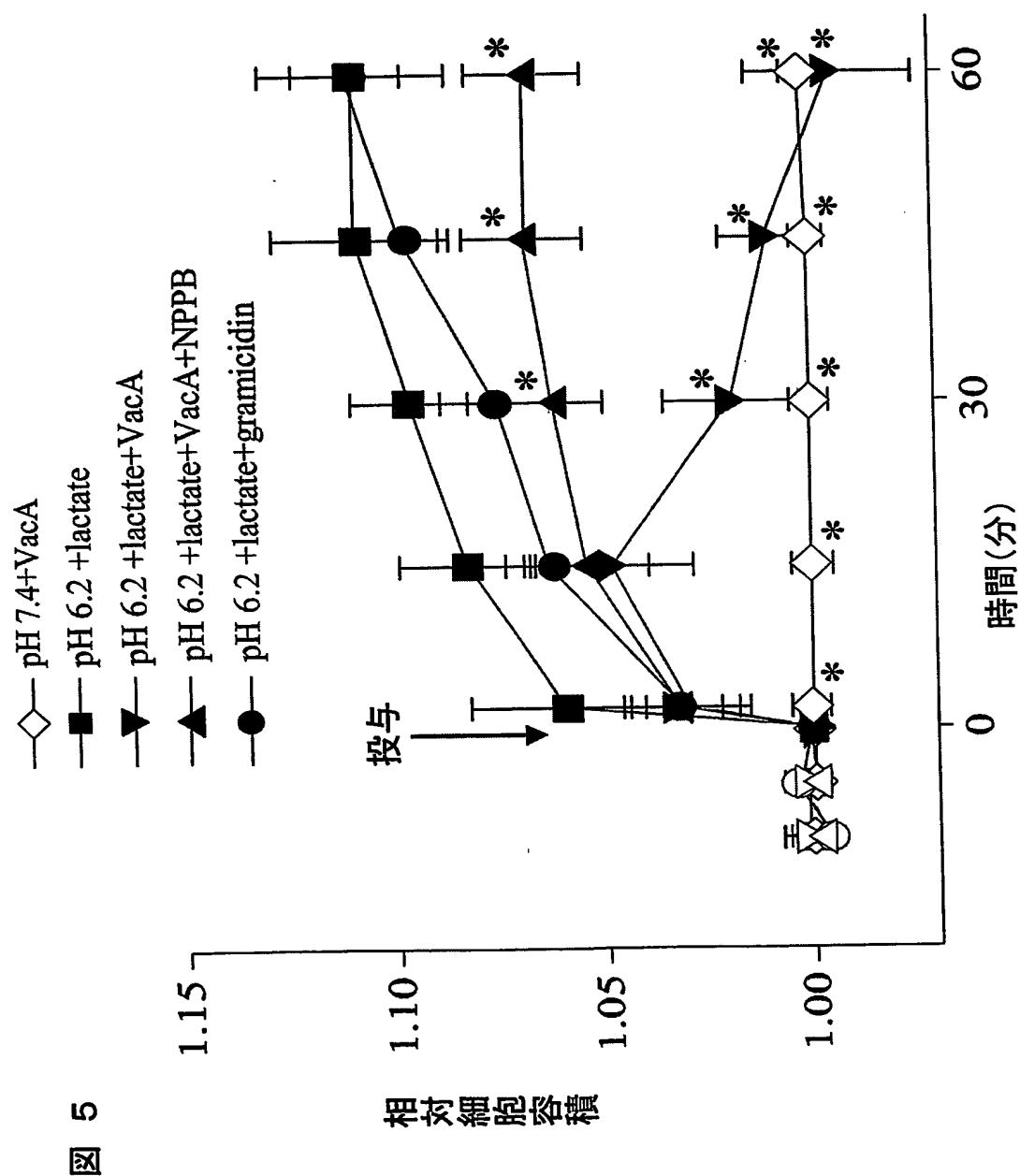


図 5

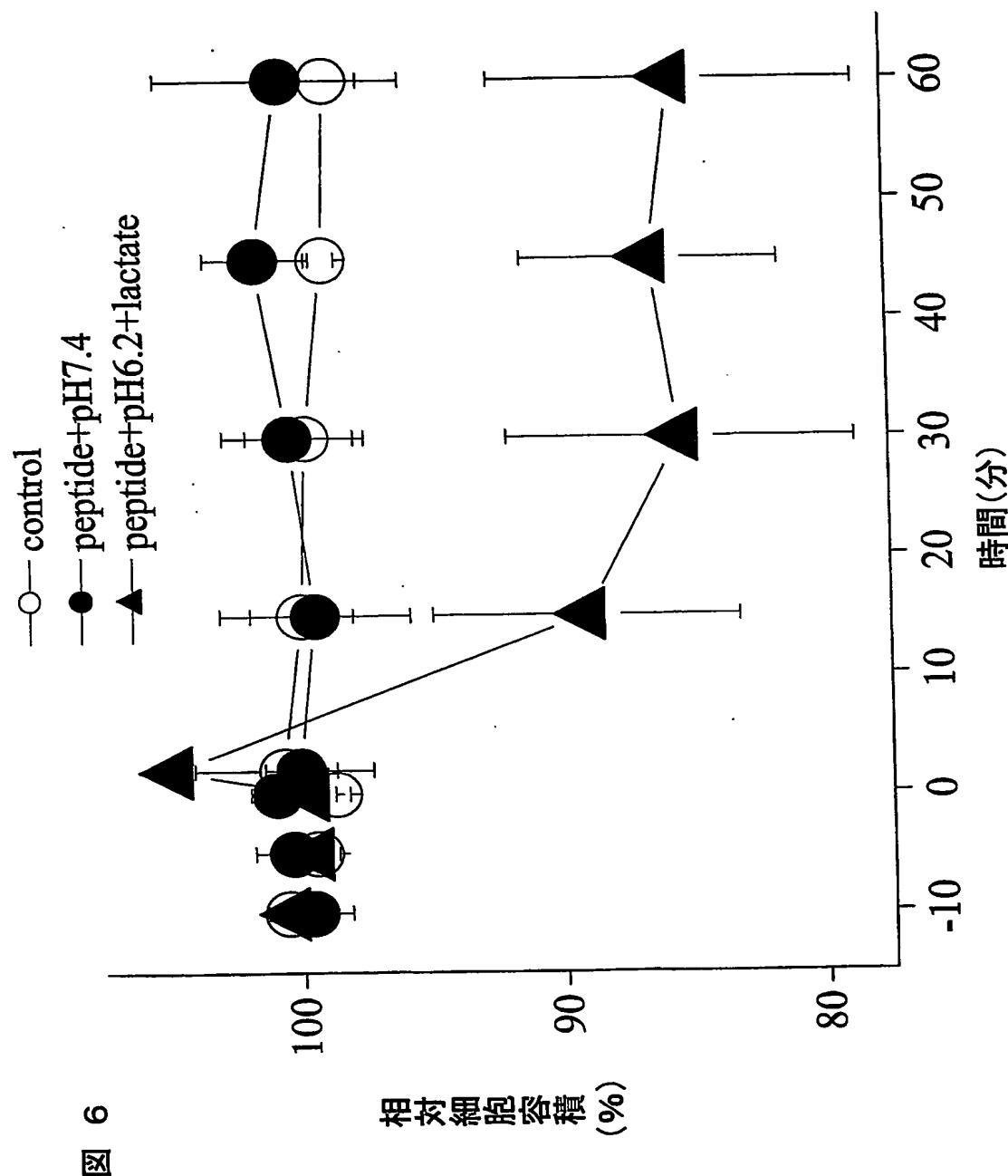


図 6

7 / 9

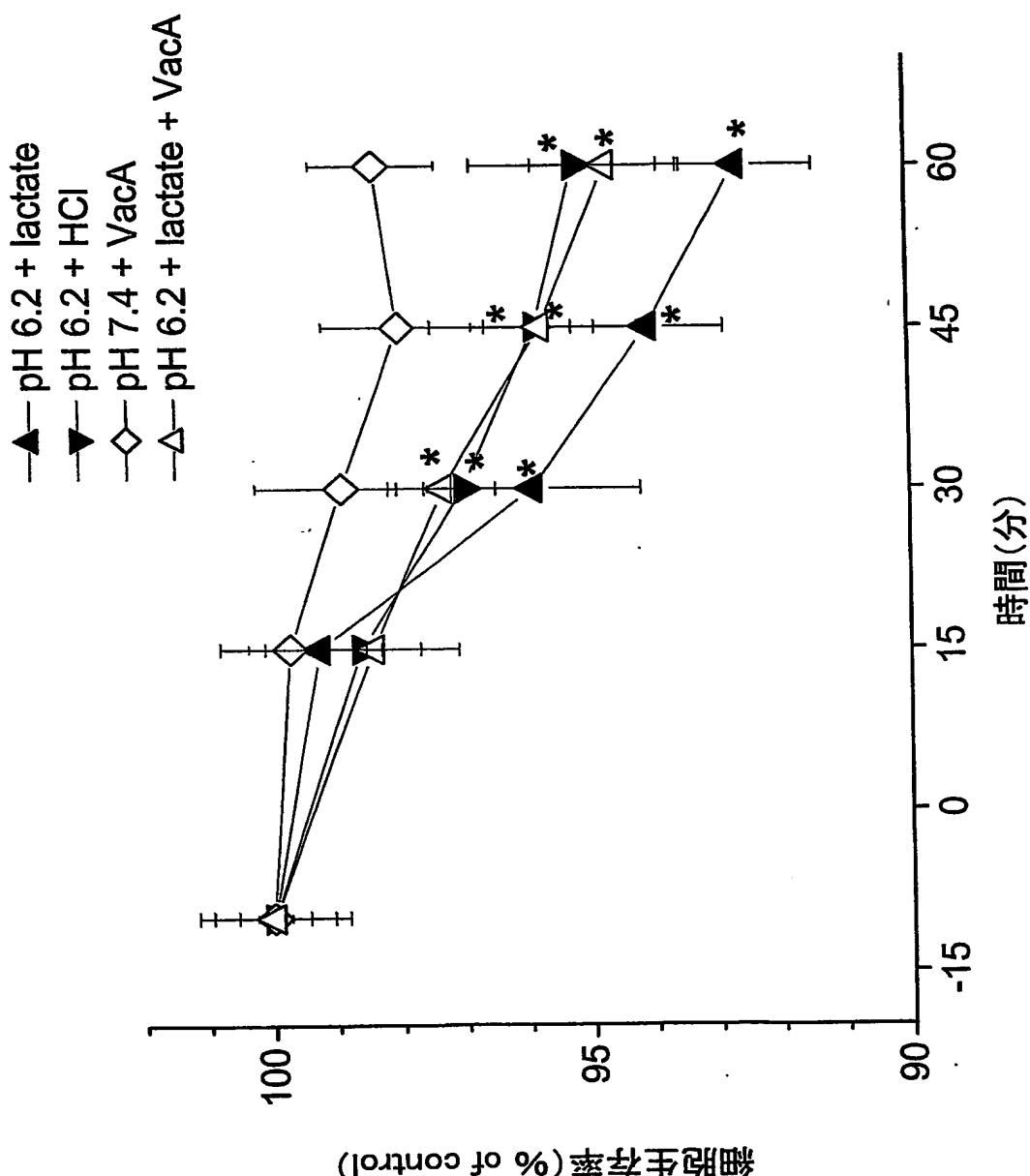
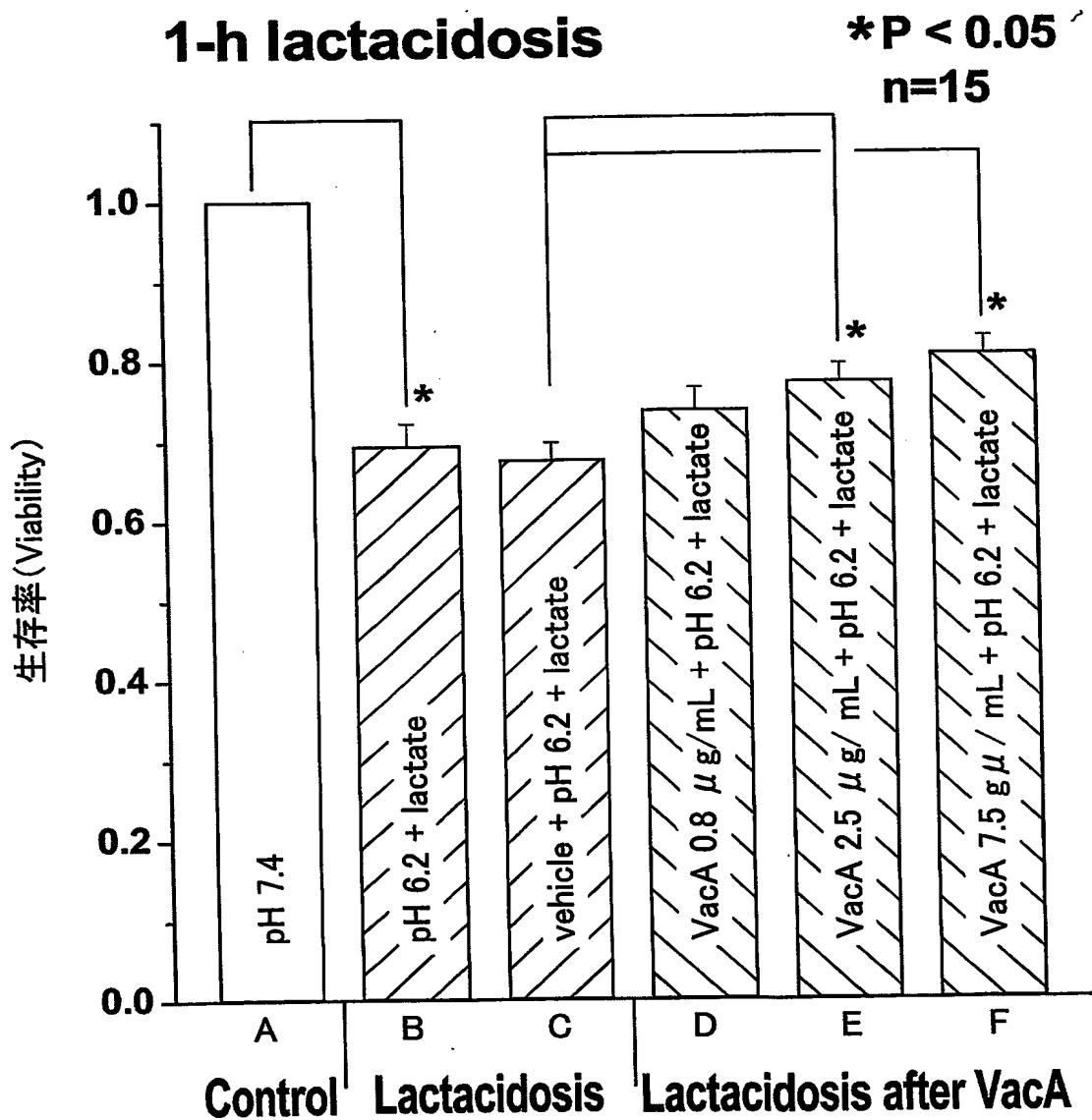


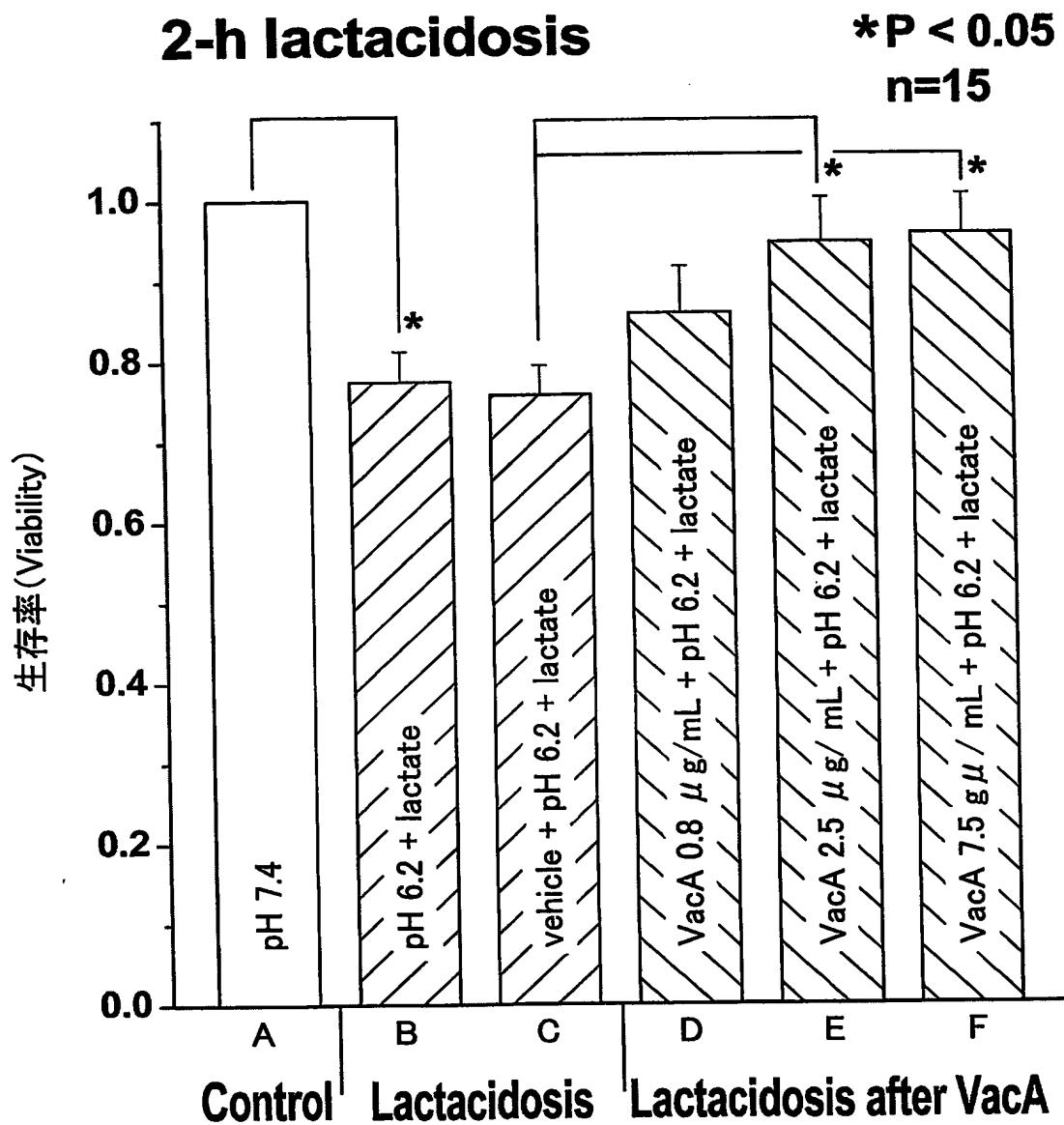
図 7

図 8



9 / 9

図 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/15201A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl' A61K38/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl' A61K38/00-58Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	NABEKURA, Takashi et al., Recovery from lactacidosis-induced glial cells swelling with the aid of exogenous anion channels, GLIA, 2003 February, Vol.41, No.3, pages 247 to 259; full text	7-14
Y	NABEKURA, T. et al., Recovery from persistent glial cell swelling under lactacidosis by introduction of anion channels, Japanese Journal of Physiology, 2001, Vol.51, Suppl., S127, full text	7-14
Y	ZENG, Yuna-Shan et al., Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia, Neuroscience Research, 2000, Vol.37, No.2, pages 113 to 125, full text	7-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 04 February, 2004 (04.02.04)	Date of mailing of the international search report 17 February, 2004 (17.02.04)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
--	--------------------

Facsimile No.	Telephone No.
---------------	---------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15201

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MITCHELL, Kathy E. et al., A synthetic peptide based on a glycine-gated chloride channel induces a novel chloride conductance in isolated epithelial cells, <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 2000, Vol.1466, pages 47 to 60, full text	7-10,12-14
A	MORISHIMA, Shigeru et al., Volume expansion sensitivity of swelling-activated Cl ⁻ channel in human epithelial cells, <i>Japanese Journal of Physiology</i> , 2000, No.50, pages 277 to 280, full text	7-14
A	WANG, Hung-Jung et al., Characterization of the C-terminal domain of <i>Helicobacter pylori</i> vacuolating toxin and its BIOCHEMICAL BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATION, 1998, Vol.250, pages 397 to 402, full text	7-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15201

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1 to 6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1 to 6 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' A61K38/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' A61K38/00-58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	BIOSIS (STN)
REGISTRY (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	NABEKURA, Takashi <i>et al</i> , Recovery from lactacidosis-induced glial cell swelling with the aid of exogenous anion channels, GLIA, 2003 Feb., Vol. 41, No. 3, pp247-259, 全文	7-14
Y	NABEKURA, T. <i>et al</i> , Recovery from persistent glial cell swelling under lactacidosis by introduction of anion channels, Japanese Journal of Physiology, 2001, Vol. 51, Suppl., S127, 全文	7-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.02.2003

国際調査報告の発送日

17.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4 C 2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	ZENG, Yuan-Shan <i>et al</i> , Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia, <i>Neuroscience Research</i> , 2000, Vol. 37, No. 2, pp113-125, 全文	7-14
Y	MITCHELL, Kathy E. <i>et al</i> , A synthetic peptide based on a glycine-gated chloride channel induces a novel chloride conductance in isolated epithelial cells, <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 2000, Vol. 1466, pp47-60, 全文	7-10, 12-14
A	MORISHIMA, Shigeru <i>et al</i> , Volume expansion sensitivity of swelling-activated Cl ⁻ channel in human epithelial cells, <i>Japanese Journal of Physiology</i> , 2000, No. 50, pp277-280, 全文	7-14
A	WANG, Hung-Jung <i>et al</i> , Characterization of the C-terminal domain of <i>Helicobacter pylori</i> vacuolating toxin and its relationship with extracellular toxin production, <i>BIOCHEMICAL BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATION</i> , 1998, Vol. 250, pp397-402, 全文	7-14

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 1-6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲1-6は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。